



دانشگاه علوم پزشکی قزوین

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی
استان قزوین

دانشکده پزشکی

گروه میکروبیشناسی و ایمنی شناسی پزشکی

پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد

عنوان:

بررسی فراوانی ژن های کد کننده متالوبتالاکتامازها در ایزوله های آسینتوباکتر جمع آوری شده از

بیمارستان های آموزشی شهر قزوین

استاد راهنما:

دکتر امیر پیمانی

استاد مشاور:

دکتر امیر جوادی

نگارنده:

شاهین بلوری حنفی

سال تحصیلی: تابستان ۹۶

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

تقدیم به:

پدر و مادر

عزیز و بزرگوarm که علیرغم تحمل سختی‌ها و
دشواری‌های فراوان مسیر پرپیچ و خم کسب دانش و معرفت
را برایم هموار نموده و از دعای خیرشان بی نصیب نبوده‌ام.

با تشکر از؛ اساتید بزرگوارم،

جناب آقای دکتر امیر پیمانی

جناب آقای دکتر تقی ناصرپور

سرکار خانم دکتر معصومه اصلانی مهر

که بدون کمک‌ها و پیگیری‌هایشان تهیه این اثر به هیچ عنوان امکان‌پذیر نبود.

- **مقدمه:** آسینتوباکتر بومانی یکی از مطرح‌ترین پاتوژن‌های مرتبط با عفونت‌های بیمارستانی با پتانسیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار بالا است که امروزه مورد توجه قرار گرفته است که علیرغم پیشرفت‌های بسیار در سیستم‌های مراقبت‌های بیمارستانی این میکروارگانیسم همچنان در صدر ارگانیسم‌های درگیر کننده خصوصاً در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) از سوی سازمان جهانی بهداشت (WHO) در مرکز توجه می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آسینتوباکترهای ایزوله شده از بیمارستان‌های آموزشی استان قزوین و ردیابی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز (MBL) از قبیل bla_{SPM}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP} و ... است.

- **روش بررسی:** در این مطالعه‌ی توصیفی مقطعی ۱۹۷ ایزوله آسینتوباکتر بومانی از بیمارستان‌های آموزشی شهر قزوین به‌دست آمد که بعد از تأیید ایزوله‌ها با روش‌های استاندارد آزمایشگاهی، حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به چندین آنتی‌بیوتیک متفاوت براساس استاندارد CLSI انجام پذیرفت و سپس به‌واسطه‌ی تکنیک PCR ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مقاوم β لاکتاماز مورد بررسی قرار گرفتند.

- **نتایج:** در این مطالعه، ۱۷۲ ایزوله به‌دست آمده به ایمی پنم و مروپنم مقاوم بوده و از این بین تنها ۱ نمونه حاصل ژن bla_{VIM} و ۳ نمونه حاصل bla_{IMP} بودند.

- **نتیجه‌گیری:** این مطالعات نشان‌دهنده‌ی افزایش روند مقاومت آنتی‌بیوتیکی آسینتوباکتر بومانی به سبب تولید آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز است. لذا با توجه به اهمیت بالینی این سویه‌های مقاوم در بیمارستان‌های مورد مطالعه، شناسایی سریع ارگانیسم‌های مولد این آنزیم و به‌کارگیری ابزارهای مناسب جهت کنترل و جلوگیری از انتشار آنها ضروری است.

چکیده:

آسینتوباکتر بومانی یکی از مهمترین پاتوژن های فرصت طلب مرتبط با عفونت های بیمارستانی شامل زخم، باکتری می، سپتی سمی، عفونت های جراحی و امروزه به عنوان ارگانیزم شایع بین افراد بستری در بخش مراقبت های ویژه است. درمان عفونت های ناشی از آسینتوباکتر به دلیل مقاومت های وابسته به ساختارهای متفاوت ژنتیکی دشوار است. استفاده بیش از حد مواد ضد میکروبی منجر به پدید آمدن سویه های با مقاومت چندگانه شده است.

مقاومت چندگانه به ارگانیزمی اطلاق می شود که نسبت به آنتی بیوتیک های خانواده آمینوگلیکوزید، فلوروکینولون و بتالاکتام مقاوم است. تا سال های اخیر کارباپنم ها به عنوان داروی انتخابی در درمان آسینتوباکتر بومانی مطرح بود اما گزارش های مقاومت به این دسته از آنتی بیوتیک ها از دهه ۱۹۹۰ گزارش گردید.

کارباپنم ها گروهی از آنتی بیوتیک های بتالاکتام هستند که طیف وسیع تری نسبت به پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها دارند و شامل ایمی پنم، مروپنم، دری پنم و ارتاپنم هستند. مقاومت به کارباپنم ها مرتبط با چندین روش است همچون موتاسیون نقطه ای در ژن های کد کننده ساختارهای هدف دارو، پمپ های افلاکس و فعالیت آنزیم های غیر فعال کننده که مهم ترین روش مقاومت هستند و تحت عنوان آنزیم های بتالاکتام مطرح است. این آنزیم ها حلقه ی بتالاکتام را می شکنند. بتالاکتامازهای هیدرولیز کننده ی کارباپنم ها در گروه ملکولی بی و دی قرار می گیرند که به عنوان خطرات مهمی در دو دهه گذشته مطرح اند.

کارباپنم های کلاس B تحت عنوان متالوبتالاکتاماز شناخته می شوند که در بین ایزوله های آسینتوباکتر بومانی توسط پلاسمید کد می شوند. متالوبتالاکتامازها توانایی انتقال بین باکتری ها را دارند که اولین گزارش ها از این

پدیده در سال ۱۹۸۸ در ژاپن انجام پذیرفت. این نوع آنزیم ها در جایگاه فعال خود دارای یون فلزی اند که توسط ترکیباتی همچون EDTA و ترکیبات حاوی تیول مهار می شوند و شامل IMP، VIM، NDM، GIM، SPM و سایرین است.

در بین ایزوله های بدست آمده OXA-51-like امروزه شناسایی اختصاصی آسینتوباکتر بومانی توسط بررسی ژن انجام می گیرد.

در دنیای جدید آسینتوباکترهای مقاوم به کارباپنم ها به عنوان نگرانی جدی در بیمارستان ها محسوب می شود و اولین همه گیری از آن از بیمارستان های امریکا در سال ۱۹۹۱ گزارش شده است.

هدف از انجام این آزمایش بررسی شیوع آسینتوباکتر بومانی، بررسی مقاومت آن ها نسبت به داروهای کارباپنم و ردیابی ژن های مولد آنزیم های متالوبتالاکتماز است.

۱) فصل اول

- ۱-۱-۱ تاریخچه ۲
- ۲-۱-۱ لغت شناسی ۲
- ۳-۱-۱ مرفولوژی ۲
- ۴-۱-۱ طبقه بندی ۲
- ۵-۱-۱ زیستگاه طبیعی باکتری ۵
- ۲-۱ عفونت های بیمارستانی ۵
- ۱-۲-۱ تاریخچه عفونت های بیمارستانی ۵
- ۲-۲-۱ شیوع عفونت های بیمارستانی ۷
- ۳-۲-۱ اپیدمیولوژی و راه های انتقال آن ۸
- ۴-۲-۱ عوامل افزایشده خطر عفونت بیمارستانی ۱۰
- ۵-۲-۱ انواع عفونت های بیمارستانی ۱۳
- ۶-۲-۱ میکروارگانیسم های موثر در عفونت های بیمارستانی ۱۶
- ۳-۱ آنتی بیوتیک ها ۱۷
- ۱-۳-۱ آنتی بیوتیک های غیر بتالاکتام ۱۸
- ۲-۳-۱ آمینوگلیکوزیدها ۱۸
- ۳-۳-۱ آنتی بیوتیک های بتالاکتام ۱۹
- ۴-۳-۱ مقاومت آنتی بیوتیکی ۲۲
- ۵-۳-۱ چگونگی ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی ۲۳
- ۶-۳-۱ منشا مقاومت آنتی بیوتیکی ۲۴
- ۷-۳-۱ بتالاکتامازها ۲۵

۲۷.....	۸-۳-۱ متالوبتالاكتامازها
۳۳.....	۹-۳-۱ مهارکننده متالوبتالاكتاماز
۳۳.....	۱۰-۳-۱ تشخیص متالوبتالاكتامازها
۳۷.....	۱۱-۳-۱ اپیدمیولوژی متالوبتالاكتامازها
۳۸.....	۴-۱ نقش آسینتوباکتر در ایجاد عفونت بیمارستانی
۴۰.....	(۲ فصل دوم-بررسی متون
۴۴.....	(۳ فصل سوم- مواد و روش ها
۴۵.....	۱-۳ مواد و روش ها.
۴۵.....	۲-۳ اهداف پژوهش .
۴۵.....	۱-۲-۳ اهداف جزئی طرح
۴۶.....	۳-۳ تعریف واژه‌ها.
۴۶.....	۴-۳ محدودیت طرح
۴۶.....	۵-۳ هدف از تحقیق حاضر
۴۶.....	۶-۳ نوع پژوهش
۴۶.....	۷-۳ جامعه پژوهش
۴۷.....	۸-۳ واحد پژوهش ..
۴۷.....	۹-۳ متغیرها.....
۴۷.....	۱۰-۳ روش انتخاب نمونه.....
۴۷.....	۱۱-۳ روش اجرای پژوهش.....
۴۷.....	۱۲-۳ جمع آوری نمونه.....
۴۸.....	۱۳-۳ شناسایی و تایید ایزوله‌های اسینتوباکتر جمع آوری شده

۴۸	۱-۱۳-۳ محیط مک کانکی کارد
۴۸	۲-۱۳-۳ محیط OF
۴۹	۳-۱۳-۳ محیط TSI
۴۹	۴-۱۳-۳ محیط SIM
۴۹	۱۴-۳ نگهداری ایزوله‌ها
۵۰	۱۵-۳ بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی با روش DAD
۵۰	۱-۱۵-۳ مواد و وسایل مورد نیاز تست آنتی بیوگرام
۵۱	۲-۱۵-۳ تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل نیمه مک فارلند
۵۱	۳-۱۵-۳ کنترل کیفی دیسک‌ها
۵۱	۴-۱۵-۳ روش کار تست آنتی بیوگرام
۵۲	۱۶-۳ واکنش زنجیره پلیمرز
۵۲	۱-۱۶-۳ استخراج DNA
۵۳	۲-۱۶-۳ مواد مورد نیاز جهت انجام PCR
۵۳	۳-۱۶-۳ پروسه انجام PCR
۵۵	۴-۱۶-۳ تکثیر ژن‌های مولد متالوبتالاکتاماز
۵۵	۱-۴-۱۶-۳ پرایمرهای مورد استفاده
۵۶	۵-۱۶-۳ برنامه دمایی
۵۷	۱۷-۳ آشکارسازی و الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل
۵۷	۱-۱۷-۳ مواد و وسایل مورد نیاز برای الکتروفورز
۵۸	۲-۱۷-۳ محلول رنگ آمیزی
۵۸	۳-۱۷-۳ انجام الکتروفورز و روش تهیه ژل

۴) فصل چهارم: نتایج ۶۰

۴-۱ جمع آوری نمونه ۶۱

۴-۲ توزیع فراوانی ایزوله های جمع آوری شده ۶۲

۴-۳ تایید ایزوله های اسپنتوباکتریومانی ۶۳

۴-۴ تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ۶۳

۴-۵ آزمایش PCR برای شناسایی ژن های مولد آنزیم های متالوبتالاکتاماز ۶۵

۵) فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۶۷

۵-۱ بحث ۶۸

۵-۲ نتیجه گیری ۷۰

۶) منابع ۷۲

فهرست جداول:

- جدول ۱-۳ : پرایمرهای به کار رفته در این آزمایش ۵۵
- جدول ۲-۳ : حجم و غلظت نهایی مواد PCR برای ژن‌های blaVIM و blaNDM:blaIMP ۵۶
- جدول ۳-۳ : برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن ۵۷
- جدول ۱-۴ : پراکندگی نمونه بر اساس بخش بیمارستان ۶۱
- جدول ۲-۴ : پراکندگی نمونه بر اساس نمونه بالینی ۶۲
- جدول ۳-۴ : حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها ۶۴

فهرست تصاویر:

شکل ۱ : تصویر از ژل برای ردیابی IMP-1-----۶۵

شکل ۲ : تصویر از ژل برای ردیابی VIM-1-----۶۶